PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : G01B 9/04, G02B 21/16, 21/34 — A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 98/28592**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Juli 1998 (02.07.98)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/02994

(22) Internationales Anmeldedatum: 20. Dezember 1997 (20.12.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 54 824.1 23. Dezember 1996 (23.12.96) DE
297 01 663.6 3. Februar 1997 (03.02.97) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG [DE/DE]; Seminarstrasse 2, D-69117 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: CREMER, Christoph [DE/DE]; Mombertplatz 23, D-69126 Heidelberg (DE). HAUSMANN, Michael [DE/DE]; Paul-Löbe-Strasse 6, D-67071 Ludwigshafen (DE). BRADL, Joachim [DE/DE]; Max-Planck-Strasse 33, D-69198 Schriesheim (DE). RINKE, Bernd [DE/DE]; Auf dem Höfchen 23, D-66459 Kirkel (DE).

(74) Anwalt: RUDOLPH, Ulrike; In der Schanz 10, D-69198 Schriesheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

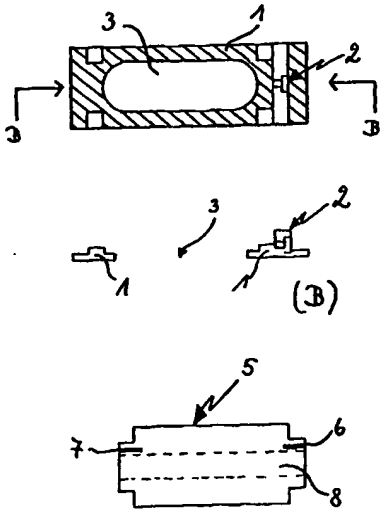
Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: METHOD AND DEVICES FOR MEASURING DISTANCES BETWEEN OBJECT STRUCTURES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNGEN ZUR DISTANZMESSUNG ZWISCHEN OBJEKTSTRUKTUREN

(57) Abstract

The invention relates to a method and devices for far field microscopy and flow fluorometry for geometrical telemetry between fluorchrome-marked object structures, which are the structures to be measured, wherein distances can be smaller than the half width of the principal maximum of the effective point image function. According to this method, the measuring structures are marked with fluorescent colorants having different or the same spectral signature depending on the distance between said structures. Calibration targets of defined sizes and spatial arrangements are marked with the same fluorescent colorants. Calibration targets and measuring structures are prepared together or separately on an object holder and submitted to microscopic or flow-fluorometric examination. In each case, two defined calibration targets of different spectral signature are measured according to wavelength-dependent imaging and locational behavior of the corresponding optical system. The measuring values thus obtained are compared with the previously known actual distances, and the difference is used as calibrating value for correcting the misalignment determined by the optical system in the detection of measuring structures. The devices comprise calibrating targets and an axial tomograph for implementing the inventive method.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und Vorrichtungen für die Fernfeldmikroskopie und Flußfluorometrie zur geometrischen Distanzmessung zwischen fluorochrommarkierten Objektstrukturen ist gleich Meßstrukturen, wobei die Distanzen geringer sein können als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion. Bei dem Verfahren werden die Meßstrukturen je nach Abstand voneinander mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener oder gleicher spektraler Signatur markiert mit den gleichen Fluoreszenzfarbstoffen werden Kalibriertargets definierter Größe und räumlicher Anordnung markiert. Kalibriertargets und Meßstrukturen werden zusammen oder separat auf einem Objekthalter präpariert und mikroskopisch oder flußfluorometrisch untersucht. Jeweils zwei definierte Kalibriertargets verschiedener spektraler Signatur werden unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisationsverhaltens des jeweiligen optischen Systems vermessen, die dabei ermittelten Meßwerte werden mit den vorbekannten tatsächlichen Distanzwerten verglichen, und die Differenz wird als Kalibrierwert zur Korrektur des durch das optische System bedingten Versatzes in der Detektion der Meßstrukturen verwendet. Bei den Vorrichtungen handelt es sich um Kalibriertargets und um einen Axialtomograph zur Durchführung des o.g. Verfahrens.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Verfahren und Vorrichtungen zur Distanzmessung zwischen Objektstrukturen

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und Vorrichtungen für die Fernfeldmikroskopie und Flußfluorometrie zur geometrischen Distanzmessung zwischen fluorochrommarkierten Objektstrukturen, wobei die Distanzen geringer sein können als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion.

Stand der Technik :

Durch den Einsatz hochspezifischer Marker, wie z.B. DNA-Proben oder Protein-Sonden, ist es möglich, in biologischen (Mikro-)Objekten, insbesondere in Zellen, Zellkernen, Zellorganellen oder auf Chromosomen (im Folgenden abkürzend auch Objekt genannt), nahezu beliebig kleine (Sub-)Strukturen zu markieren. Solche Marker können Strukturen in Dimensionen von einigen µm (10^{-6} m) bis zu wenigen zehn nm (10^{-9} m) spezifisch darstellen. Üblicherweise werden in diese Marker Reportermoleküle eingebunden, die eine hohe Affinität zu entsprechenden Komplexverbindungen tragen, an die Fluorochrome, aber auch kolloidale Mikropartikel (z.B. Gold) angebunden sind. Es können aber auch solche Fluorochrome/Komplexe direkt in die Marker eingebaut werden. Das zur Verfügung stehende Farbemissionsspektrum der Fluorochrome reicht vom tief blauen über grün, rot bis in den infraroten Spektralbereich. Ebenso können Fluorochrome verwendet werden, die sich nicht in ihrem Spektrum der Anregung und/oder Fluoreszenzemission unterscheiden, sondern bei denen die Lebensdauer ihrer Fluoreszenzemission als Parameter zur Unterscheidung genutzt wird.

Letztere haben den Vorteil, daß wellenlängenabhängige fokale Shifts nicht auftreten. Fluorochrome können auch ein unterschiedliches Emissionsspektrum haben und damit verschiedene spektrale Signatur besitzen, aber mit derselben Photonenenergie angeregt werden, z.B. durch Mehrphotonenprozesse. Auch in diesem Fall können wellenlängen-

abhängige fokale Shifts in der Anregung zwischen Fluorochromen verschiedener spektraler Signatur vermieden werden.

Die oben genannten, an spezifische (Sub-)Strukturen in biologischen Mikroobjekten gebundenen Fluorochrome werden im folgenden als Fluoreszenzmarker bezeichnet. Unter Fluoreszenz wird im folgenden jede Photonenwechselwirkung verstanden werden, bei der zwischen dem Anregungsspektrum und dem Emissionsspektrum eines Stoffes Unterschiede auftreten, die nicht auf monochromatische Absorption oder Streuung zurückgeführt werden können. Dies schließt insbesondere auch Mehrphotonenwechselwirkungen ein, bei denen die Anregungswellenlängen größer sein können als die Emissionswellenlängen. Ferner wird hier der Begriff Fluoreszenz auch für die eng damit verwandten Phänomene der Lumineszenz, insbesondere die Phosphoreszenz verwendet. Dies schließt insbesondere längere mittlere Fluoreszenzlebensdauern ein, z.B. Fluoreszenzlebensdauern im Bereich von bis zu mehreren oder vielen msec (Millisekunden). Im folgenden werden die eng verwandten Vorgänge der Luminizsenz, Phosphoreszenz und Fluoreszenz als gleichermaßen erfindungsrelevant angesehen. Stimmen Anregungsspektrum und/oder Emissionspektrum und/oder die Fluoreszenzlebensdauern zweier Fluoreszenzmarkern überein, so haben sie hinsichtlich der jeweiligen Parameter die gleiche spektrale Signatur. Unterscheiden sie sich in einem oder mehreren für die Messung relevanten Parametern, so habe sie unterschiedliche spektrale Signatur.

Für die Detektion der Fluoreszenzmarker in ausgedehnten biologischen Objekten und für die quantitative Lokalisation bezüglich definierter Objektpunkte/Objektstrukturen (Distanz- und Winkelmessungen) werden eine Reihe von lichtmikroskopischen Meßverfahren eingesetzt. Hierbei handelt es sich vor allem um (a) die Epifluoreszenzmikroskopie, (b) die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, (c) die Laser-Scanning Flußfluorometrie, (d) das Fernfeldmikroskopieverfahren des "Point-Spread-Function-Engineerings" und (e) die Wellenfeldmikroskopie.

a) Bei der Epifluoreszenzmikroskopie mit einem klassischen aufrechten oder inversen Epifluoreszenzmikroskop wird das biologische Objekt durch dasselbe Objektiv beleuch-

tet, durch das es auch detektiert wird. Anregungslicht und emittierte Fluoreszenz werden durch entsprechende optische Filter spektral diskrimiert und in verschiedenen Strahlengängen geführt. Die erzielbare Auflösung, d.h. die kleinste noch meßbare Distanz zwischen zwei punktförmigen Objektstrukturen, die mit Fluorochromen gleicher spektraler Signatur markiert sind, ist entweder durch das Abbe-Kriterium (= das Maximum 0. Ordnung des Beugungsbildes eines Punktobjektes ist im 1. Minimum des Beugungsbildes eines zweiten Punktobjektes lokalisiert) oder durch die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion gegeben. Diese hängt von der jeweiligen Wellenlänge, der Numerischen Apertur des verwendeten Objektivs, sowie von den lokalen Brechzahlen der Objekte, des Einbettungsmediums, der eventuell verwendeten Deckgläser und der eventuell eingesetzter Immersionsflüssigkeiten ab. (Ihre Dimension kann bei hoher Numerischer Apertur geringer als die Wellenlänge des zur Anregung verwendeten Lichtes sein.).

b) Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie wird im Gegensatz zur Epifluoreszenzmikroskopie ein Laser in das Objekt fokussiert und die Fluoreszenz konfokal detektiert. Zur Erzeugung eines dreidimensionalen Bildes wird das Objekt mit dem Fokuspunkt in allen drei Raumrichtungen (x, y, z) abgerastert. Die erzielbare Auflösung ist wie bei der Epifluoreszenzmikroskopie durch die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion gegeben und hängt von der jeweiligen Wellenlänge, der Numerischen Apertur des verwendeten Objektivs, sowie von den lokalen Brechzahlen der Objekte, des Einbettungsmediums, der eventuell verwendeten Deckgläser und der eventuell eingesetzter Immersionsflüssigkeiten ab.

c) Bei der Laser-Scanning Flußfluorometrie werden die Objekte beispielsweise durch einen freien oder in einer Küvette befindlichen Trägerflüssigkeitsstrahl einzeln durch eine entsprechende Lichtverteilung eines Fokus geführt (während bei der Epifluoreszenzmikroskopie und der konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie die Objekte auf Objekthaltern, d.h. Objektträgerplättchen, -trägerkapillaren, -trägerkammern, -trägerflüssigkeiten u.a., fixiert vorliegen). Die Lichtverteilung ist üblicherweise spaltförmig, d.h. das Objekt wird bezüglich einer Achse gerastert. Die erzielbare Auflösung ist durch die

Fokusbreite des verwendeten Laserstrahls und/oder geeignet gewählter Detektionsblenden bestimmt, wobei die Variabilität in der Objekttrajektorie (= laminarer, üblicherweise zentraler "Flüssigkeitsfaden", der die Objekte trägt), abhängig vom Trägermedium und -verfahren, die Fokustiefe und damit auch die minimale Fokusbreite vorgibt. Der Vorteil von Flußfluorometrieverfahren liegt üblicherweise in der gegenüber der Epifluoreszenzmikroskopie und der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie wesentlich höheren zeitlichen Detektionsrate, die bis zu einigen tausend Objekten pro Sekunde reichen kann. Die Fokusbreite entspricht der Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion der Slit-Scan Optik unter den verwendeten Bedingungen.

d) Bei den Fernfeldmikroskopieverfahren des "Point-Spread-Function-Engineerings": wird die Punktbildfunktion optisch geschmälert. Dies kann durch kohärente Überlagerung von zwei und mehreren Punktbildfunktionen erfolgen (z.B. 4Pi-Mikroskopie) oder durch Auslöschen der Fluoreszenz von Fluorochromen, die sich im Randbereich des jeweiligen zentralen Punktbildfunktionsmaximums befinden (z.B. STED-Mikroskopie, Ground-Depletion-Mikroskopie). Da die Auflösung eines Mikroskops durch die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion gegeben wird, wird somit die Halbwertsbreite verringert und die Auflösung verbessert.

e) Bei der Wellenfeldmikroskopie gemäß dem US-Patent Nr. 4,621,911 werden lumineszente Präparate im optischen Mikroskop mit einem stehenden Wellenfeld beleuchtet (Standing Wave Field Fluorescence Microscopy, SWFM). Die Präparate werden in einer Zone äquidistanter ebener Wellenfronten angeordnet und zur Fluoreszenz oder Phosphoreszenz angeregt. Der Abstand der Wellenfronten und ihre Phase können zur Bilderzeugung variiert werden. Aus einzelnen optischen Schnitten kann durch Computer-Bildverarbeitung die dreidimensionale Verteilung der fluoreszenten bzw. lumineszenten Objektpunkte rekonstruiert werden.
Die ebenen Wellenfronten werden durch kohärente Überlagerung zweier Laserstrahlen unter einem definierten Winkel zur optischen Achse des Mikroskopsystems erzeugt, wobei der Winkel den Abstand der Wellenfronten untereinander bestimmt — bei

gegebener Wellenlänge und Brechungsindex. An Stelle von zwei sich kreuzenden Laserstrahlen kann das Wellenfeld auch dadurch erzeugt werden, daß ein Laserstrahl nach geeigneter Reflexion unter einem bestimmten Winkel mit sich selbst zur Interferenz gebracht wird. Im Mikroskopaufbau sind in diesem Falle die Wellenfronten senkrecht zur optischen Achse des detektierenden Objektives angeordnet. Die Fluoreszenz bzw. Lumineszenz wird entweder wie beim Epifluoreszenzmikroskop durch entsprechende optische Filter spektral diskriminiert und in verschiedene Strahlengänge geführt oder konfokal detektiert. Die erzielbare Auflösung ist wie bei der Epifluoreszenzmikroskopie und der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie durch die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion gegeben und hängt von der jeweiligen Wellenlänge, der Numerischen Apertur des verwendeten Objektivs, sowie von den lokalen Brechzahlen der Objekte, des Einbettungsmediums, der eventuell verwendeten Deckgläser und der eventuell eingesetzter Immersionsflüssigkeiten ab.
Lateral besitzt das System eine Auflösung wie ein übliches Epifluoreszenzmikroskop oder Konfokales Laser Scanning Mikroskop; in axialer Richtung dagegen wird eine Tiefendiskriminierung und damit wesentlich verbesserte Auflösung erzielt.

Nachteile des Standes der Technik:

1.) Da die effektiven Punktbildfunktionen stark beeinflußt werden von der jeweiligen lokalen Brechzahl und Absorption im Objekt, im Einbettungsmedium des Objektes und in der Immersion (einschließlich eventuell vorhandener Deckgläser), sind Distanzmessungen zwischen Objektstrukturen von der effektiven — d.h. der lokal im markierten Objektpunkt gegebenen — Punktbildfunktion abhängig. Diese unterscheidet sich im allgemeinen deutlich von berechneten Punktbildfunktionen des verwendeten Mikroskops. Auch die unter technisch optimierten Randbedingungen gemessenen Punktbildfunktionen unterscheiden sich in der Regel von den unter praktischen Routinelaborbedingungen in biologischen Objekten erzielbaren effektiven Punktbildfunktionen. Da diese effektiven Punktbildfunktionen meist nicht zur Verfügung stehen, greift man zur Kalibrierung der Distanzmessungen auf ideale, berechnete Ergebnisse zurück bzw. auf Kalibrierungsmessungen, die unter Standardbedingungen durchgeführt wurden, wie z.B.

Reflexionsverfahren. Beide Verfahren erfolgen zu Lasten der Präzision bei der dreidimensionalen Distanzmessung in biologischen Mikroobjekten. Als Folge ergibt sich eine erhebliche Unsicherheit der Bestimmung der tatsächlichen räumlichen Distanz zwischen den Objektstrukturen; bei biologischen Objekten beinhalten quantitative Größenabschätzungen Unsicherheiten von bis zu mehreren Mikrometern. Eine Korrektur dieses Fehlers ist bei den bisher verwendeten Methoden nur begrenzt möglich, nämlich nur unter Standardbedingungen, deren tatsächliche Realisierung/Einhaltung im biologischen Objekt jedoch nicht genau kontrolliert bzw. gewährleistet werden kann.

Zwei Objektstrukturen der gleichen spektralen Signatur können nur dann separiert werden, wenn sie mindestens eine Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion von einander entfernt sind.

2.) Bei allen oben beschriebenen Fernfeld-Verfahren besteht das Problem, daß die Breite des Hauptmaximums der Punktbildfunktion und damit die Auflösungsgrenze von der relativen Lage im Raum abhängt. So ist z.B. bei der Epifluoreszenzmikroskopie oder der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie die Punktbildfunktion lateral (senkrecht zur optischen Achse) schmäler als axial (in Richtung der optischen Achse). Bei statischen Mikroskopieverfahren kann dieser Nachteil zwar mit Hilfe der sog. Mikroaxialtomographie überwunden werden. Bei diesem Verfahren werden die (biologischen) Objekte in Kapillaren oder auf Glasfasern angeordnet und definiert im Mikroskop um eine Achse gedreht, die normalerweise senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops steht. Dabei werden Abstandsmessungen in derjenigen Richtung durchgeführt, die die schmalste Halbwertsbreite der effektiven Punktbildfunktion besitzt. Bei der Flußfluorometrie ist dieses Verfahren jedoch kaum einsetzbar.

3.) Bei der. "eindimensionalen" Wellenfeldmikroskopie (SWFM) führt das periodische Wellenfeld bei epifluoreszenter Detektion in Verbindung mit Verfahren des Optical Sectioning zu einer Mehrdeutigkeit in der Abbildung der Objektstrukturen größer als $\lambda/2n$ (λ=Wellenlänge der Anregung, n= effektiver Brechungsindex). Diese Mehr-

deutigkeit erschwert zunächst eine effektive Nutzung der durch das Interferenzmuster erzielten Auflösungsverbesserung.

4.) Hochpräzisionsdistanzmessungen mit Lichtmikroskopie-Fernfeldverfahren gelten nach dem Stand der Technik nur bis in den Größenordnungsbereich hundert Nanometer durchführbar. Für Messungen im Distanz- und Genauigkeitsbereich der Größenordnung 10 nm werden die Verfahren der Elektronenmikroskopie, Rastertunnelmikroskopie, atomare Rasterkraftmikroskopie, biologische und optische Nahfeldmikroskopie eingesetzt. Bei diesen Verfahren handelt es sich jedoch — im Gegensatz zu den optischen Fernfeldverfahren — um flächenorientierte und nicht volumenorientierte Meßverfahren; d.h. sie eignen sich im Prinzip nur für Strukturuntersuchungen und Distanzmessungen an Oberflächen und in dünnen Schichten. Informationen über die Lage von Objekten bzw. Objektstrukturen im dreidimensionalen Raum können allenfalls anhand von mechanisch präparierten Schnittserien und einer Auswertung von Messungen in Einzelbildern erhalten werden. Dreidimensionale Messungen in intakten oder gar vitalen biologischen Mikroobjekten, z.B. dreidimensionalen (konservierten) Zellen, Zellkernen oder Zellorganellen, sind nicht möglich.

Aufgabe der Erfindung:

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren für die Fernfeldmikroskopie und eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens bereitzustellen, mit dem bzw. mit der es möglich ist, Distanzmessungen zwischen Objektstrukturen, deren Abstand voneinander geringer ist als das Auflösungsvermögen des betreffenden Fernfeldmikroskops, d.h. die weniger als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion voneinander entfernt liegen, unabhängig von der Lage der betreffenden Objektstrukturen im dreidimensionalen Raum, mit hoher Genauigkeit durchzuführen.

Erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe:

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens der eingangs genannten Art, das ein Kalibrierverfahren für die Fluoreszenzfernfeldmikroskopie und Flußfluorometrie ist und die folgenden Verfahrensschritte umfaßt:

- Vor, während oder nach der Präparation des betreffenden Objekts auf bzw. in einem Objekthalter, insbesondere Objektträgerplättchen, Objektträgerfaser/-kapillare oder Objektträgerflüssigkeit, werden die zu untersuchenden bzw. zu ortenden Strukturen (Meßstrukturen) mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener und/oder gleicher spektraler Signatur markiert, d.h. solche zu ortende Strukturen (Meßstrukturen), die sich in unmittelbarer Nähe zueinander, nämlich innerhalb der Halbwertsbreite des Hauptmaximums ihrer effektiven Punktbildfunktion, befinden, werden mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener spektraler Signatur markiert, während solche Meßstrukturen, deren Abstand voneinander größer ist als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion, mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener oder gleicher spektraler Signatur markiert werden. Zwei zu ortende Meßstrukturen dürfen immer dann mit der gleichen spektralen Signatur markiert sein, wenn sie z.B. durch ihre relative Lage oder durch andere Kriterien eindeutig identifiziert werden können.
- Mit den gleichen Fluoreszenzfarbstoffen werden Kalibriertargets definierter Größe und räumlicher Anordnung markiert,
- die fluoreszierenden Kalibriertargets werden entweder zusammen mit den Objekten oder separat auf bzw. in dem bzw. einem Objekthalter (Objektträgerplättchen, Objektträgerfaser/-kapillare, Objektträgerflüssigkeit o.a.) präpariert.
- (Untersuchungs-)Objekt und Kalibriertargets werden unter übereinstimmenden Bedingungen, gleichzeitig oder nacheinander mikroskopisch oder flußfluorometrisch untersucht.
- Jeweils zwei definierte Kalibriertargets verschiedener spektraler Signatur werden unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisationsverhaltens des jeweiligen optischen Systems (Mikroskop oder Flußfluorometer) vermessen, die dabei ermittelten Messwerte gleich Ist-Werte werden mit den vorbekannten tatsächlichen Distanzwerten gleich Soll-Werten (d.h. den aufgrund der

Geometrie berechneten Solllokalisationen) verglichen, und die Differenz zwischen Ist-Werten und Soll-Werten, nämlich der Kalibrierwert, wird zur Korrektur des durch das optische System bedingten Versatzes in der Detektion unterschiedlicher Emissionsloci insbesondere der Meßstrukturen verwendet.

Mit anderen Worten: Die Distanzmessung zwischen den (je nach Abstand voneinander) mit verschiedenen oder gleichen spektralen Signaturen markierten Objekt-(Sub-) Strukturen - im folgenden auch Meßstrukturen genannt – wird anhand der hochpräzisen Lokalisation unabhängiger (Kalibrier-)Targets mit entsprechend spektraler Signatur und mit bekannter Größe und räumlicher Anordnung, unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisationsverhaltens des jeweiligen optischen Systems durchgeführt, wobei die Kalibriermessung zwischen den (Kalibrier-) Targets und die Messung im biologischen Objekten unter gleichen System- und Randbedingungen stattfindet. Diese Kalibriertargets haben diesselbe oder eine höhere Multispektralität wie die zu messenden (Objekt-)Strukturen. Sie können direkt in den biologischen Objekten angeordnet sein, oder als separate Präparate auf einem Objekthalter (Objektträgerplättchen oder Objektträgerfaser/-kapillare oder Objektträgerflüssigkeit o.ä.) vorliegen oder Teil eines Objekthalters sein.

Zwei oder mehrere fluoreszierende Meßstrukturen in intakten, dreidimensionalen biologischen Objekten, deren Abstand und Ausdehnung kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion ist, können aufgrund ihrer unterschiedlichen spektralen Signatur (Fluoreszenzabsorptionswellenlängen und/oder Fluoreszenzemissionswellenlängen und/oder Fluoreszenzemissionslebensdauern) diskriminiert werden, d.h. ihr Abstand untereinander kann bestimmt werden.
Die Abstandsmessung wird auf die Lokalisation der einzelnen Meßstrukturen reduziert und kann — nun auch in der optischen Fernfeldmikroskopie oder Flußfluorometrie — mit einer wesentlich höheren Genauigkeit als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der Punktbildfunktion durchgeführt werden. Die Lokalisation des Schwerpunkts der betreffenden Meßstrukturen wird auf die Maximalintensität ihres Fluoreszenzsignals angepaßt. D. h. aus dem gemessenen (beugungsbegrenzten) Signals (=Intensitätskurve)

eines Fluoreszenzpunktes (=fluoreszierende Meßstruktur) wird — unter Berücksichtigung der Gesamtinformation aus Haupt- und Nebenmaxima — der Schwerpunkt (das Baryzentrum) des Signals bestimmt und damit der Ort der Meßstruktur. Bei fehlerfreiem optischen System und infolgedessen idealer Symmetrie der gemessenen Intensitätsverteilung (=Verlauf der Intensitätskurve) kolokalisiert der Schwerpunkt (das Baryzentrum) der Intensitätskurve innerhalb der Lokalisationsgenauigkeit mit dem Hauptmaximum (=Maximim 0. Ordnung des Beugungsbildes) der gemessenen Intensitätsverteilung.

Vorteile der Erfindung:

Das Verfahren erlaubt es mittels optischer Fernfeld-Mikroskopie bzw. Scanning-Fluß-fluorometrie, geometrische Distanzen in biologischen Mikro-Objekten zu messen, wobei die zu bestimmenden Distanzen geringer sein können als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion im Objekt. Da der Informationsgehalt der erfindungsgemäß durchgeführten Distanzbestimmungen einer bei erhöhter Auflösung gewonnenen Distanzmessung entspricht, kann abkürzend auch von Auflösungsäquivalent gesprochen werden. Die Messungen von solch geringen Distanzen in biologischen Mikroobjekten ist von großer Bedeutung z.B. für wissenschaftliche Fragestellungen in Biologie und Medizin, aber auch für bestimmte Aspekte der klinischen Forschung und der Diagnostik an Präparaten.

Die multispektrale Kalibrierung erlaubt es, in situ Messungen über das Abbildungsverhalten des Systems am konkreten biologischen Objekt durchzuführen. Bei Verwendung der Fluoreszenzlebensdauer als alleinigem Parametertyp und/oder bei Anregung der Fluorochrome mit derselben bzw. denselben Photonenenergie(n) entfällt aufgrund der Kalibrierung die in situ Korrektur des chromatischen Versatzes in der Objektebene. Für höchstauflösende Fernfeld-Mikroskoptypen wie z.B. das Wellenfeldmikroskop und bei Verwendung erfindungsgemäßer Fluoreszenzmarker ermöglicht die Erfindung dreidimensionale geometrische Distanzmessungen in biologischen Objekten bis hinunter zu molekularer Präzision (d.h. Auflösungsäquivalent besser 10 nm).

Im Gegensatz zur Elektronenmikroskopie bzw. zur optischen und nicht-optischen Nahfeldmikroskopie bleibt die dreidimensionale Struktur des zu untersuchenden Objektes intakt, da auf mechanische Schnitte verzichtet wird. Damit können in dreidimensional konservierten Mikroobjekten 3D-Distanzmessungen mit einem Bereich kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion vorgenommen werden. Insbesondere eröffnet das Verfahren die Möglichkeit, dreidimensionale Distanzmessungen auch unter vitalen Bedingungen des biologischen Objektes durchzuführen. Im Vergleich zu den im Stand der Technik bekannten Verfahren des Point Spread Function Engineering besteht ein wesentlicher Vorteil der vorliegenden Erfindung darin, daß auch bereits vorhandene Systeme der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie als Basis für die erfindungsgemäße Steigerung des Auflösungsäquivalents verwendet werden können.

Für die Detektion der Fluoreszenzemission eignen sich sowohl ein- und zweidimensionale rasternde als auch nicht-rasternde elektronische bzw. optoelektronische Detektorsysteme.

Ein Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens bietet sich insbesondere an für multispektrale Präzisionsdistanzmessung in biologischen Mikroobjekten zur absoluten und relativen Lokalisation und Distanzmessung von fluoreszenten Meßstrukturen beliebiger spektraler Signatur.

Vorteilhafte Ausführungsformen und Weiterbildungen der Erfindung :

Um bei Verwendung von statischen Mikroskopsystemen eine möglichst scharfe Punktbildfunktion zu erhalten, sollte das biologische Objekt für die mikroskopischen Untersuchung axialtomographisch gedreht werden können (Mikroaxialtomographie). Auf diese Weise können Anisotropien in der 3D-Punktbildfunktion so überwunden werden, daß zwei Objektpunkte jeweils in einer Ebene mit der relativ besten Punktbildfunktion liegen. Das biologische Objekt ist vorzugsweise in oder an einem drehbaren Träger mit

kreisförmigem, rechteckigem oder vieleckigem Querschnitt fixiert oder in anderer Weise befestigt.
Der Träger besteht aus einem für die verwendeten Lichtwellenlängen transparenten Material, dessen Brechungsindex sich um höchstens 12 % von dem des umgebenden Mediums unterscheidet. Er kann hohl oder massiv sein und und sein Querschnittsdurchmesser sollte kleiner oder gleich 300 µm betragen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der (im Querschnitt dreieckige, viereckige oder vieleckige) Träger für axialtomographische Untersuchungen um die Winkel $\phi_m = 360/3$ [°], $\phi_m = 360/4$ [°], oder $\phi_m = 360/n$ [°] gedreht, wobei n die Zahl der planaren Seiten des Trägers ist. Eine Abstandsmessung zwischen den Kalibriertargets und/oder Meßstrukturen wird bei einem, mehreren, oder jedem dieser Winkel, jeweils für eine zwei oder mehrere spektrale Signaturen vorgenommen.

Zur Ermittlung von Ist- und Sollwerten, zu deren Vergleich und zur Bestimmung des Korrekturwerts/Kalibrierwerts werden vorzugsweise die folgenden Verfahrensschritte durchgeführt:
- ein oder mehrere Kalibriertargets B mit einem Abstand größer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximum der effektiven Punktbildfunktion vom Schwerpunkt der N Meßstrukturen wird/werden mit einer beliebigen spektralen Signatur markiert,
- die Abstände d_{ik} (i, k = 1... N, i ≠k) der Schwerpunkte der spektral getrennten Beugungsfiguren der N Meßstrukturen und die Abstände d_{iB} der N Meßstrukturen zum Kalibriertarget B werden gemessen, wobei automatisierte Verfahren der Bildanalyse angewendet werden,
- für eine Meßstruktur werden die Strecken d_{ik} und d_{iB} jeweils in der Ebene der schmalsten Punktbildfunktion sowie alle übrigen Distanzen gemessen werden, wozu das Objekt axialtomographisch jeweils um einen definierten Winkel ϕ_m gedreht wird,
- optische Aberrationen aus den Kalibrierungsmessungen werden korrigiert, und an die korrigierten gemessenen Abstände d_{ik} (ϕ_m) und d_{iB} (ϕ_m) wird jeweils eine Cosinusfunktion $A_{ik} \cos (\phi_m + \theta_{ik})$ bzw. $A_{iB} \cos (\phi_m + \theta_{iB})$ mit geeigneter Phasenverschie-

bung angepaßt,

- die Maxima A_{ik} und A_{iB} der Anpassungsfunktion von d_{ik} bzw. d_{iB} werden durch den Vergrößerungsfaktor dividiert und als euklidischer Abstand D_{ik} bzw. D_{iB} der N Meßstrukturen untereinander bzw. der Abstände der Meßstrukturen zum Bezugspunkt B bestimmt.

Für die Bestimmung der Maxima werden vorzugsweise zusätzlich die diesen entsprechenden Minima des Abstandes z_{ik}, z_{iB} in der zu der Ebene der d_{ik}, d_{iB} orthogonalen Ebene herangezogen und analog ausgewertet.

Die Ermittlung aller Koordinaten der N Meßstrukturen und ihrer Relativkoordinaten zum Bezugspunkt B, d.h. die Ermittlung der Positionen x_i, y_i, z_i und x_k, y_k, z_k bzw. der Abstände $x_k - x_i$, $y_k - y_i$, $z_k - z_i$ und $x_B - x_i$, $y_B - y_i$, $z_B - z_i$, erfolgt erfindungsgemäß auf der Grundlage der mikroskopisch gemessenen 3D-Abstände D_{ik} bzw. D_{iB} ,. vorzugsweise unter Verwednung des folgenden Gleichungssystems

$$D^2_{ik} = (x_k - x_i)^2 + (y_k - y_i)^2 + (z_k - z_i)^2$$

$$D^2_{iB} = (x_B - x_i)^2 + (y_B - y_i)^2 + (z_B - z_i)^2$$

$$D^2_{kB} = (x_B - x_k)^2 + (y_B - y_k)^2 + (z_B - z_k)^2$$

Zur Absicherung der ermittelten Meßergebnsisse sollte die vorstehend beschriebene Vorgehensweise für mehre Kalibriertargets B und die gleichen N Meßstrukturen durchgeführt werden.

Die Koordinaten und Abstände der N Meßstrukturen können anhand der Schwerpunkte ermittelt werden, die sich aus Schwerpunktmittelungen der Messungen zu allen Bezugspunkten ergeben.

Insbesondere für graphische Darstellungen werden die ermittelten Positionen x_i, y_i, z_i und x_B, y_B, z_B vorzugsweise mit einer Punktbildfunktion gefaltet, die eine Halbwertsbreite mit dem jeweils erreichten Auflösungsäquivalent besitzt.

Zur Fluorochrommarkierung von Meßstrukturen und Kalibriertargets werden vorzugsweise solche Fluorochrome verwendet, die im ultravioletten, sichtbaren und/oder

infraroten Lichtwellenlängenbereich angeregt werden können und die im ultravioletten, sichtbaren und/oder infraroten Lichtwellenlängenbereich emittieren.

Bei einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung werden markierte Regionen des biologischen Objekts mit bekannter Distanz voneinander als Kalibriertargets verwendet. Diese Markierung kann beispielsweise mit geeigneten biochemischen Sonden durchgeführt werden.
Die Verwendung biologischer Kalibriertargets hat gegenüber der Verwendung synthetischer Kalibriertargets, beispielsweise Kalibrierkügelchen, den praktischen Vorteil, daß bei der Kalibrierung neben den optischen Randbedingungen des Objektes zusätzlich präparativ bedingte Randeffekte in die Kalibrierung einfließen, wie z.B. das Verhältnis aus tatsächlichen Fluoreszenzsignal zu unspezifischem Hintergrund (das durch automatische Bildanalysealgorithmen bestimmt wird).

Als nicht-biologische bzw. synthetische Kalibriertargets eignen sich ganz besonders Mikrokügelchen, die die gleiche oder eine höhere multispektrale Signatur als die zu ortenden Meßstrukturen aufweisen. Sie werden wie die biologischen Objekte behandelt. Solche Kalibriertargets sind vorzugsweise auf Objekthaltern in definierter Raumanordnung fixiert. Die Fixierung kann bereits bei der Fabrikation der betreffenden Objekträger geschehen , was insbesondere für die Routinebenutzung von Vorteil ist.

Zur Durchführung der erfindungsgemäßen Distanzmessung unter Verwendung eines Mikroskops mit Axialtomograph werden die biologischen Objekte mit den Meßstrukturen und den/die Kalibriertargets in oder auf einer Mikrokapillare oder Glasfaser als Objekthalter bzw. Objektträger präpariert. Die Kapillare/Faser hat einen exakt definierten Durchmesser, wobei verschiedene Durchmesser möglich sind. Zur Festlegung dieser Kapillare/Faser auf dem Mikroskoptisch wird erfindungsgemäß eine spezielle Halterung vorgeschlagen, die aus einem starren, vorzugsweise dorsiventral abgeplatteten Rahmen besteht, an bzw. auf dem wenigstens eine Lagerbuchse montiert ist, in der eine Mikrokapillare oder Glasfaser um ihre Längsachse rotierfähig und mit der Rotationsachse senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops gelagert werden kann. Die Lager-

buchse(n) sollten (sind) so angeordnet sein, daß die Rotationsachse der Kapillare/Faser senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops verläuft. Die Drehung der Untersuchungsobjekte in oder an der Kapillare/Faser erfolgt durch Drehung der Kapillare/Faser direkt, vorzugsweise vermittels eines Drehmotors. Das hat den Vorteil, daß die einmal eingestellte und justierte Optik des Mikroskops unverändert beibehalten werden kann. Zur Unterstützung bzw. Stabilisierung der zu drehenden Kapillare/Faser gegen Durchhängen oder Verschieben im Bereich der Ausnehmung des Rahmens ist ein austauschbarer Einsatz für den Rahmen vorgesehen. Dieser Einsatz kann insbesondere aus Plastik oder Glas gefertigt sein und eine grabenförmige Vertiefung in Längsrichtung der Kapillare/Faser aufweisen. Zur leichteren Handhabung, vor allem beim Einsetzen in den Rahmen, kann dieser Einsatz einen oder mehrere Klemmschlitz(e) aufweisen.
Der erfindungsgemäße Rahmen hat vorzugsweise ähnliche Außenmaße wie ein herkömmliches Objektträgerplättchen, d.h. seine Länge beträgt weniger als 77 mm und seine Breite weniger als 27 mm, und er ist sehr leicht, d.h. er wiegt beispielsweise nur ca. 15 Gramm. Mit einem Computergesteuerten Schrittmotor kann die Kapillare/Faser um einen exakt definierten Winkel um ihre Achse gedreht werden. Da diese Drehkraft direkt an der Kapillare/Faser ansetzt und nicht an ihrer Halterung, ist die Gefahr, daß die Kapillare/Faser verschoben wird und aus dem Blickfeld des Mikroskops gerät oder daß gar der ganze Mikroskoptisch verrückt bzw. verschoben wird, wesentlich verringert.

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Distanzmessungsverfahrens unter Verwendung eines Laser-Scan- Flußfluorometers, das einen frei oder in einer Küvette strömenden Flüssigkeitsstrahl umfaßt, und mit einer oder mehren Laserstrahlquelle(n), deren Laserstrahl(en) auf die zentrale Trajektorie des Flüssigkeitsstrahls fokussiert sind, sollte die Laseroptik derart ausgewählt und angeordnet sein, daß der bzw. die Laserstrahlen bandförmig auf die Objekttrajektorie (die die Objekte führende zentrale Trajektorie des Flüssigkeitsstrahls) fokussiert ist bzw. sind.
Die Bandform des bzw. der Laserstrahlen kann hierfür vorteilhaft einfach durch Interferenzstreifen zweier oder mehrerer sich kreuzender Teilstrahlen erzeugt werden. Die Linsen und Blenden im Detektionsstrahlengang sind vorzugsweise derart ausgewählt und angeordnet, daß allein die Fluoreszenzemission aus dem zentralen Interferenzstreifen

auf den Detektor abgebildet wird. Außerdem sollte der Detektor in einzelne Detektionspixel aufgeteilt, um eine räumliche Auflösung der Fluoreszenzemission sowohl in Flußrichtung als auch senkrecht zur Flußrichtung zu ermöglichen. Das hat den Vorteil, daß eine Lokalisation der fluoreszierenden Meßstrukturen und/oder Kalibriertargets nicht nur in Flußrichtung aufgrund der Bewegung des Objektes mit konstanter Geschwindigkeit sondern auch senkrecht dazu erfolgen kann.

Bei einem Flüssigkeitsstrahl in z-Richtung und einer Laseroptik aus Laserstrahl(en) in x-Richtung und Blende(n) und Detektor(en) in y-Richtung ermöglicht das Verfahren eine Verbesserung der Auflösung in zwei Dimensionen. Wird zusätzlich eine entsprechende Laseroptik mit Laserstrahl(en) in y-Richtung und Blende(n) und Detektor(en) in x-Richtung angeordnet, erhält man eine Auflösungsverbesserung in drei Dimensionen. In beiden Fällen ist die Erstellung von Punktbildfunktionen möglich, die von der Orientierung des Objekts nahezu unabhängig sind.

Ausführungsbeispiele zur näheren Erläuterung der Erfindung :

BEISPIEL 1: Distanzmessung zwischen Genabschnitten von Chromosomen in einem Zellkern (unabhängig vom Mikroskoptyp)

In einem Zellkern nimmt das Chromatin der einzelnen Chromsomen definierte Teilregionen ein. Innerhalb einer oder mehrerer solcher chromosomalenTeilregionen werden die zu ortenden Strukturen , d.h. die Meßstrukturen, z.B. kleine Chromosomenabschnitte wie Gene oder Teilstücke von Genen, mit einer im Stand der Technik bekannten Methode der Fluoreszenz in situ Hybridisierung spezifisch markiert, und zwar mit Fluorochromen verschiedener bestimmter spektraler Signaturen M_1, M_2, M_3, ... Die Abstände zwischen den Markierungsorten (den markierten Meßstrukturen) liegen unter der klassischen Auflösung, d.h. sie sind kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximum der effektiven Punktbildfunktion. Die Markierung der (Objekt-) Strukturen (Meßstrukturen) erfolgt derart, daß die spektralen Signaturen an den zu ortenden Strukturen (Meßstrukturen) mit nahezu der gleichen Dynamik vertreten sind.

Das biologische Objekt wird auf einer Glasfaser exakt definierten Durchmessers oder in einer runden oder rechteckigen Kapillare definierter Dimensionen präpariert.

Um die Distanzen zu bestimmen, werden mikroskopierbare Präparate mit Kalibriertargets hergestellt, und zwar unter den gleichen physikalischen und chemischen Versuchsbedingungen wie das Objekt bzw. die zu ortenden Objektstrukturen (= Meßstrukturen).

Als Kalibriertargets bzw. als Präparate mit Kalibriertargets dienen beispielsweise:
a) mikroinjizierbare Kügelchen einer spektralen Signatur (monochromatisch):
Die Kügelchen sind nach bekannten Verfahren mit jeweils einem Fluorochrom, d.h. monochromatisch markiert und aufgrund ihrer Größe von den auszumessenden (zu ortenden) Strukturen im Objekt (den Meßstrukturen) unterscheidbar. Man injiziert solche Kalibrierkügelchen, die die im Objekt vorhandenen spektralen Signaturen der Meßstrukturen repräsentieren, ansonsten aber vorzugsweise identisch sind (hinsichtlich Größe, Geometrie, Materialbeschaffenheit etc.). Mit anderen Worten: Die spektralen Signaturen der Meßstrukturen sowie der Kalibriertargets werden so gewählt, daß unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen die von ihnen emittierten Fluoreszenzemissionen getrennt voneinander analysiert werden können. Die Injizierung und Fixierung der monochromatischen Kalibrierkügelchen erfolgt derart, daß sich die einzelnen Kügelchen verschiedener spektraler Signatur in Clustern direkt an der Glasfaser-Oberfläche oder Kapillarwand anordnen, vorzugsweise in einer Querschnittsebene der Faser bzw. Kapillare. Bei Verwendung von Präzisionsfasern und/oder -kapillaren liegen die Kügelchen folglich in definierten Abstände voneinander bzw. von einer Bezugsebene, Bezugsachse oder Bezugslinie.

b) mikroinjizierbare Testkügelchen multispektraler Signatur (polychromatisch) und gleicher spektraler Dynamik:
Die Kügelchen sind nach bekannten Verfahren mit jeweils allen bei den markierten (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen) vorkommenden spektralen Signaturen markiert.

Infolgedessen können sie an beliebige Stellen im zu vermessenden biologischen Objekt (hier Kern) injiziert werden. Eine Sollgeometrie wie bei a) ist nicht erforderlich, da für jede Signatur die chromatischen Schwerpunkte an derselben Stelle lokalisiert sein sollen. Zur Unterscheidung von den markierten (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen) können die Kügelchen entweder einer anderen Größenklasse angehören oder aber eine zusätzliche spektrale Signatur tragen, die bei den zu messenden Strukturen d.h. den Meßstrukturen (gemäß Präparationsprotokoll) nicht vorkommt.

c) simultan markierte Chromosomenregionen bekannter Distanz an einem anderen Chromosom als demjenigen, das die zu ortenden Strukturen (Meßstrukturen) trägt:
Die Kalibriertargets, d.h. hier die Chromosomenregionen mit bekanntem Abstand voneinander, sind mit Hilfe einer Probenkombination von DNA-Sequenzen, die die verschiedenen spektralen Signaturen trägt, unterschiedlich markiert. Eine Unterscheidung der chromosomalen Kalibriertargets von den zu ortenden (Chromosomen-) Strukturen (Meßstrukturen) kann beispielsweise durch unterschiedliche Fluoreszenzintensität erfolgen oder durch ein unterschiedliches Intensitätsverhältnis zwischen Fluorochromen verschiedener spektraler Signatur oder durch Verwendung eines zusätzlichen Fluorochroms mit abweichender spektraler Signatur, das bei der Fluoreszenzmarkierung der Meßtargets nicht verwendet wurde.
Es ist auch möglich, daß die Kalibriertargets einer anderen Größenklasse angehören als die zur ortenden Meßstrukturen.

Die erfindungsgemäßen Distanzmessungen werden mittels bekannter Fernfeld-Mikroskopieanlagen, bestehend aus Mikroskop, Photomultiplier und/oder Kamera und Datenverarbeitungsanlage durchgeführt. Dabei werden zum einen die Abstände zwischen den Kalibriertargets mit Fluorochrommarkierungen verschiedener spektraler Signatur gemessen. Die gemessenen Lokalisationen (d.h. die gemessenen Targetabstände) werden mit den aufgrund der Geometrie berechneten Soll-Lokalisationen (d.h. den tatsächlichen Targetabständen) verglichen und daraus der spektral bedingte Versatz (Shift) bestimmt. Dieser Versatz (Shift) ist der Kalibrierwert für die gemessenen Distanzwerte zwischen den zu ortenden (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen).

Da dieser Versatz von den optischen Eigenschaften des Präparates abhängt (z.B. Brechzahlen in den Kernen und dem Präparationsmedium), sollte die Kalibrierung in situ erfolgen. Das heißt im vorliegenden Beispiel, daß sich die Kalibriertargets neben den zu untersuchenden und markierten (chromosomalen) Strukturen (Meßstrukturen) im Kern befinden sollten. Es werden die Abstände zwischen den zu ortenden (Objekt-)Strukturen (Meßstrukturen) bzw. die Abstände zwischen den verschiedenen Farbsignalen bzw. Farbpunkten der betreffenden Meßstrukturen, z.B. zwischen dem rotfluoreszierenden und dem grünfluoreszierenden Farbpunkt (von Intensitätsmaximum zu Intensitätsmaximum oder von Schwerpunkt/Baryzentrum zu Schwerpunkt/Baryzentrum) gemessen, und dieser Meßwert wird um den mit den Kalibriertargets ermittelten (durch die verschiedene spektrale Signatur bedingten) Versatz in hochpräziser Weise korrigiert.

Bei Kalibriertargets in Gestalt von mikroinjizierbaren Testkügelchen mit multispektraler Signatur (polychromatisch) wird der chromatische Versatz aus dem Lokalisationsunterschied der Schwerpunkte für jede Signatur bestimmt. Die dafür erforderliche Identifizierung der zu einem Kalibriertarget gehörenden Fluoreszenzemission kann beispielsweise durch volumenerhaltende Schwellwertverfahren oder durch Mittelung der Segmentierungsergebnisse bei Schwellwertvariation erfolgen.

Bei Kalibriertargets in Gestalt von fluorochrommarkierten Objektregionen mit multispektraler Signatur (polychromatisch) wird der chromatische Versatz genauso bestimmt.

Als fluorochrommarkierte Kalibrierregionen eignen sich insbesondere auch Zentromerregionen, die mit einer Probenkombination von solchen DNA-Sequenzen hybridisiert werden, die alle an dieselben chromosomalen DNA-Abschnitte binden, jedoch mit Fluorochromen unterschiedlichen spektraler Signatur markiert wird. Erfolgt die Hybridisierung unter noch stringenten Bedingungen, liegen pro Zellkern zwei Markierungsregionen vor; bei nieder-stringenten Bedingungen werden aufgrund zusätzlicher Nebenbindungsregionen zusätzliche Zentromerregionen markiert, so daß die Zahl der Kalibrierungsregionen ansteigt. Das ist u.U. sehr von Vorteil.

BEISPIEL 2: Distanzmessung zwischen Genabschnitten von Chromosomen in einem Zellkern unter Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskops mit Axialtomograph

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein im Prinzipaufbau bekanntes Epifluoreszenzmikroskop mit Axialtomograph wie folgt modifiziert:
Auf den Mikroskoptisch wird anstelle eines Objektträgerplättchens eine erfindungsgemäße Halterung gemäß Fig. 1 für Mikrokapillaren oder Glasfasern, gesetzt. Diese Halterung besteht aus einem starren vorzugsweise dorsiventral abgeplatteten Rahmen 1, auf dem eine Lagerbuchse 2 montiert ist, in der eine Mikrokapillare oder Glasfaser um ihre Längsachse rotierfähig und mit der Rotationsachse senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops gelagert ist. Die Drehung des Untersuchungsobjektes in oder an der Kapillare/Faser erfolgt durch Drehung der Kapillare/Faser direkt, und zwar entweder manuell oder mittels eines Drehmotors. Das hat den Vorteil, daß die einmal eingestellte und justierte Optik des Mikroskops unverändert beibehalten werden kann.
Zur Unterstützung bzw. Stabilisierung der zu drehenden Kapillare/Faser gegen Durchhängen und Verschieben im Bereich der Ausnehmung 3 des Rahmens 1 ist ein flächiger, scheibenförmigerer Einsatz 5 austauschbar in dem Rahmen 1 angeordnet. Dieser Einsatz 5 besteht aus Plastik und weist eine grabenförmige Vertiefung 8 auf, die sich unterhalb und in Längsrichtung der Kapillare/Faser erstreckt. In seinem Randbereich ist der Einsatz 5 mit zwei schlitzförmigen Ausnehmungen 6, 7 versehen, die sich jeweils senkrecht zur Randkante erstrecken und das Einsetzen des Einsatzes 5 in den Rahmen 1 erleichtern.
Mit einem Computergesteuerten Schrittmotor wird die Kapillare/Faser in der Lagerbuchse um einen definierten Winkel um ihre Achse gedreht. Die Drehkraft setzt direkt an der Kapillare/Faser an (und nicht an ihrer Halterung), wodurch die Gefahr, daß die Kapillare/Faser beim Drehen verschoben wird und aus dem Blickfeld des Mikroskops gerät oder daß gar der ganze Mikroskoptisch verrückt bzw. verschoben wird, nahezu vollständig vermieden ist.

Das biologische Mikroobjekt, z.B. ein Zellkern, in dem die zu ortenden Meßstrukturen bereits mit Fluorochromen markiert sind und das auch bereits Kalibriertargets enthält (zur Präparation siehe Beispiel 1), befindet sich auf der Glasfaser oder in der Mikrokapillare. Der Abstand von zwei oder mehr Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets voneinander ist kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der axialen effektiven Punktbildfunktion. Mit dem Axialtomograph wird das Objekt gedreht unter ggf. automatischer Refokussierung. Die Drehung erfolgt in der Art, daß jeweils ein Abstand zwischen zwei Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets (d.h. zwischen deren Fluoreszenzintensitätsschwerpunkten) maximal wird. Der maximale gemessene Abstand entspricht dem tatsächlichen Abstand.

Ist man nur an den Abständen zwischen den Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets, d.h. nicht an ihrer absoluten räumlichen Anordnung interessiert, kann man nun von einer der bekannten Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets aus fortfahren, den Abstand zu einer dritten Meßstruktur bzw. einem dritten Kalibriertarget zu maximieren und zu bestimmen. Sind die Abstände zwischen den Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets größer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der lateralen (senkrecht zur optischen Achse) Punktbildfunktion, so genügt eine einzige spektrale Signatur; sind die Abstände dagegen kleiner, müssen die Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets durch multispektrale Signatur unterschieden werden. Die Schwerpunkte (Maxima) der Signale dienen der Lokalisierung. Sofern die untersuchten Meßstrukturen einen Durchmesser haben, der kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven lateralen Punktbildfunktion ist, werden alle Beugungsbilder der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets durch eine scharfe Punktbildfunktion bestimmt, so daß die Maxima optimal bestimmt werden können. Sind zwischen den Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets auch Distanzen größer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der lateralen Punktbildfunktion zugelassen, so ist die Bestimmung aller Abstände zwischen den Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets für $N \geq 2$ innerhalb eines Kerns bei einmaligem Drehen nur dann möglich, wenn bei jedem Drehwinkel optische Schnittserien registriert werden (siehe Beispiel 3 zur konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie).

Ist man an der absoluten Anordnung der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets im Raum interessiert, so müssen die jeweiligen Schwerpunkte (baryzentren) präzise bestimmt

werden. Durch mehrmaliges Wiederholen der gesamten Meßprozedur und statistische Auswertung kann die absolute Lokalisierung der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets, d.h. die Winkelmessung, verbessert werden.

BEISPIEL 3: Distanzmessung zwischen Genabschnitten von Chromosomen in einem Zellkern unter Verwendung eines Konfokalen Laser-Scanning Mikroskops

Von dem biologische Mikroobjekt, z.B. einem Zellkern, in dem die zu ortenden Meßstrukturen bereits mit Fluorochromen markiert ist, und das auch bereits Kalibriertargets enthält (zur Präparation siehe Beispiel 1), wird eine Serie optischer Schnitte aufgenommen. Die Meßstrukturen besitzen $l = 1,2,..,L$ spektrale Signaturen. Die spektrale Signatur der Kalibriertargets unterscheiden sich von derjenigen der Meßstrukturen z.B. in Volumen, Durchmesser, Intensität oder in der Zahl der spektralen Signaturen ($l = 1,2,..,L+1$). Die Bilder der optischen Schnitte werden für jede spektrale Signatur getrennt aufgenommen und gegebenenfalls noch der Untergrund korrigiert.

Zur Auswertung werden zum einen die Kalibriertargets identifiziert und der chromatische Versatz bestimmt. Dazu werden die Kalibriertargets unter jeder spektralen Signatur lokalisiert. Bei polychromatischen Kalibriertargets ergibt sich der spektrale Versatz aus der Differenz der Lokalisationen.

Zum anderen werden parallel zur oder im Anschluß an diese Kalibrierung die Meßstrukturen lokalisiert. Man bestimmt dabei in jeder spektralen Signatur zunächst unabhängig voneinander die Position der Schwerpunkte der gemessenen Intensitätssignale. Anschließend werden die Lokalisationen um den aus den Kalibrierungsmessungen bekannten spektralen Versatz korrigiert.

Die korrigierten Positionen der Meßstrukturen werden in Bezug auf einen Vergleichspunkt angegeben. Dieser Vergleichspunkt kann z.B. ein beliebig ausgezeichneter fester Punkt im Objekt oder der Schwerpunkt eines Kalibriertargets (z.B. eine markierte

Chromosomenregionen) oder eines sonstwie ausgezeichneten Chromosomenterritoriums sein. Es kann aber auch die Schwerpunktskoordinate aller Meßstrukturen innerhalb eines Chromosomenterritoriums sein.

Die beschriebenen Meßverfahren für die konfokale Laser Scanning Mikroskopie können auch im Zusammenhang mit Axialtomographie durchgeführt werden. Dabei wird, wie in Beispiel 2 beschrieben, das biologische Mikroobjekt um einen definierten Winkel gedreht und pro Winkel ein kompletter 3D-Bildstapel aufgenommen. Die Drehwinkelgröße wird so bestimmt, daß jeweils ein Abstand zwischen zwei Meßstrukturen maximal wird. Für jeden 3D Bildstapel wird dann, wie in Beispiel 2 beschrieben, verfahren. Der Vorteil der Drehung liegt darin, daß man einen Abstand auf die Lokalisierung zweier Punkte bezieht, die in der Lateralebene bestimmt wird und damit auf der Basis der schärfsten(steilsten) Punktbildfunktion.

Anstatt wie vorstehend beschrieben die Kalibrierung und die Distanzmessung zwischen den zu ortenden Strukturen, d.h. Meßstrukturen, in demselben biologischen Objekt durchzuführen, kann man auch die Kalibrierung unabhängig von den Meßstrukturen an gleichartigen biologischen Objekten durchführen. Bei dieser Verfahrensvariante ist die Unterscheidung zwischen den Fluoreszenzsignalen der Kalibriertargets und denjenigen der Meßstrukturen erleichtert. Anhand der mit den Kalibriertargets ermittelten Werte des optischen Versatzes kann man Eichkurven für die Distanzmessungen zwischen den Meßstrukturen erstellen. Derartige Eichkurven machen z.B. Angaben über den spektralen Versatz als Funktion von Brechungsindex und Absorption des verwendeten Immersionsmediums, der verwendeten Optik, Filter und Detektionseinheiten, der verwendeten Auswertealgorithmen, der verwendeten biologischen Objekte, der axialen und lateralen Lokalisation der Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets in ihnen etc. Die Verwendung der Information aus diesen speziellen Eichkurven zur erfindungsgemäßen Distanzmessung bietet sich insbesondere in solchgen Fällen an , bei denen einer größere Präzisionstoleranz verwendet erlaubt ist.

BEISPIEL 4: Distanzmessung zwischen Genabschnitten von Chromosomen in einem Zellkern unter Verwendung eines Wellenfeldmikroskops

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Distanzmessung unter Einsatz der Wellenfeldmikroskopie ist praktisch identisch mit dem in Beispiel 3 beschriebenen Vorgehen. Im Unterschied zum konfokalen Laser-Scanning Mikroskop ist hier die Lokalisierung in axialer Richtung wesentlich genauer als in lateraler, da hier die schärfste (steilste) Punktbildfunktion vorliegt. Durch Kombination mit Axialtomographie kann die Genauigkeit der Positionsbestimmung und Distanzmessung noch gesteigert werden.

BEISPIEL 5: Distanzmessung zwischen Genabschnitten von Metaphase-chromosomen in einem Zellkern unter Verwendung eines Laser-Scanning Flußfluorometers

Ein Laser-Scanning Flußfluorometer nutzt als Basisgerät ein Durchflußzytometer, wie es heute routinemäßig beispielsweise für Zellanalysen und -sortierung in der Immunologie oder Hämatologie eingesetzt wird. Dabei werden die biologischen Objekte in einem Flüssigkeitssystem so angeordnet, daß sie im Bereich der zentralen Trajektorie eines Flüssigkeitsstrahls, der frei oder in einer Küvette strömt, einzeln nacheinander durch einen oder mehrere Laserfoci geführt werden. Die biologischen Objekte, im vorliegenden Beispiel die Metaphasechromosomen, sind spezifisch mit einem oder mehreren Fluoreszenzmarkern markiert und werden durch die Laserstrahlen selektiv zur Fluoreszenz angeregt. Diese wird üblicherweise in mehreren optischen Detektionskanälen, die durch spektrale Filter separiert sind, registriert und integral von Photomultipliern in ein entsprechendes verstärktes elektrisches Signal umgesetzt.

Um ortsaufgelöst in einer Richtung die Fluoreszenzverteilung messen zu können, wurden sog. Slit-Scan Verfahren etabliert. Das biologische Mikroobjekt, hier Metaphase-chromosomen, d.h. längliche Objekte von typischerweise 5 bis 15 µm, wird von Flüssig-keitsstrahl mit konstanter Geschwindigkeit durch einen oder mehrere Laserstrahlen geführt, die in Strömungsrichtung so stark fokussiert sind, daß die Fluoreszenzverteilung zeitabhängig entlang des Objektes gemessen wird. Aufgrund der bekannten Fluß-

geschwindigkeit kann das pro Dektektionskanal aufgenommene, eindimensionale, zeitabhängige Fluoreszenzprofil in eine Ortsinformation transformiert werden. Die Flußgeschwindigkeiten betragen typischerweise bis zu 10 m/s, und es können bis zu einigen tausend Objekten pro Sekunde analysiert werden.

Alle bisher in der Literatur beschriebenen Slit-Scan Systeme haben in Flußrichtung eine typische Fokusbreite (gemessen aus der effektiven Punktbildfunktion) von minimal etwa 2 µm (= Auflösungsäquivalent), da aus prinzipiellen Gründen bei stärkerer Laserfokussierung die Fokustiefe stark abnimmt und somit eine gleichmäßige Auflösung im Bereich möglicher Partikeltrajektorien (typischerweise 10 µm um die zentrale Achse des Flüssigkeitsstrahls) nicht mehr gewährleistet ist. Hinzu kommt, daß bei den im Stand der Technik beschriebenen Verfahren nur ein eindimensionaler Scan möglich ist.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Distanzmessung im Nanometerbereich wird ein im Prinzipaufbau bekanntes Laser-Scanning Flußfluorometer durch die folgend Anordnung (hier exemplarisch für einen Laser und einen Detektionskanal dargestellt) modifiziert:

Zwei kohärente Teilstrahlen des Lasers mit gleicher Intensität und ebenen Wellenfronten werden unter einem kleinen Winkel zueinander in den Flüssigkeitsstrahl fokussiert und im Fokalbereich zur Interferenz gebracht. Es entsteht ein Muster aus konstruktiver und destruktiver Interferenz, wobei die Interferenzstreifen senkrecht zur Strömungsrichtung verlaufen. Die Halbwertsbreite der Interferenzstreifen hängt nicht mehr von der Breite des Laserfokus, sondern nur noch von der Wellenlänge und dem Winkel der Laserteilstrahlen zueinander ab. Bei einem Winkel von 28° zwischen den beiden Teilstrahlen kann man für 500 nm Laserwellenlänge die Halbwertsbreite des Hauptinterferenzstreifens zu etwa 500 nm abschätzen.

Die Interferenzstreifen können mit der notwendigen Tiefe erzeugt werden, so daß alle möglichen Objekttrajektorien des Flüssigkeitsstrahl mit gleicher Streifenbreite ausgeleuchtet werden.

Da mehrere Interferenzstreifen gleichzeitig erzeugt werden, ist die Objektinformation vieldeutig. Die bekannte Maßnahme der Rückfaltung der gemessenen Intensitätsverteilung mit dem Streifenmuster d.h. mit der Punktbildfunktion bringt hier keinen oder nur geringen Auflösungsgewinn gegenüber herkömmlichen Slit-Scan Verfahren, da aufgrund eines geeignet zu wählenden Rauschfilters höhere Ortsfrequenzen und damit Auflösung verloren geht. Erfindungsgemäß wird stattdessen wie folgt verfahren:
In die Detektionsoptik sind Schlitzblenden mit einem Schlitzverlauf parallel zur Orientierung der Interferenzstreifen einbaut. Mit geeigneten Linsen bilden diese Schlitzblenden nur diejenige Fluoreszenz auf den Photomultiplier ab, die zwischen den beiden ersten Minima des Interferenzhauptstreifens angeregt wird. Im vorliegenden Beispiel können mit einem Aperturwinkel der Detektionsoptik von 19° (in Luft) und einem Minimalabstand von ca. 1 µm Objekttrajektorien von 6 µm um die zentrale Flüssigkeitsachse mit nahezu gleicher optischer Auflösung beobachtet bzw. untersucht werden.
Um nicht nur eindimensionale Scans zu realisieren, wird der Detektionsschlitz in kleine Rechteckelemente aufgeteilt — z.B. durch eine CCD-Zeile. Diesen CCD-Elementen können signalverstärkende optische Elemente vorgeschaltet sein. Günstigerweise ordnet man die CCD-Elemente in einem möglichst großen Kreissegment um den Flüssigkeitsstrahl an. Die Detektionsoptik kann dann teilweise durch Mikrolinsen vor jedem Element ersetzt werden.

Eine Alternative besteht darin, bei einem Flüssigkeitsstrahl in z-Richtung eine Laseroptik aus Laserstrahl(en) in x-Richtung und Blende(n) und Detektor(en) in y-Richtung anzuordnen, wodurch man eine Verbesserung der Auflösung in zwei Dimesionen erreicht. Bei Anordnung einer weiteren Laseroptik mit Laserstrahl(en) in y-Richtung und Blende(n) und Detektor(en) in x-Richtung erhält man eine Auflösungsverbesserung in drei Dimensionen.

Pro Detektionselement wird von dem Objekt, das sich beliebig orientiert und mit konstanter Geschwindigkeit im Flüssigkeitsstrahl durch den zentralen Laserinterferenzstreifen bewegt, ein Fluoreszenzprofil durch dieses Objekt aufgenommen. Kleine fluoreszierende Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets in den biologischen Objekten

erscheinen in den Scanprofilen als Intensitätspeaks. Aus den Intensitätsmaxima und der Zuordnung der jeweiligen Scanprofilen zu den CCD-Elementen lassen sich die fluoreszenten Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets im Objekt lokalisieren. Dies kann bei gleicher spektraler Signatur z.B. auf einen definierten Objektsbezugspunkt hin geschehen.

Bei verschiedener spektraler Signatur kann man z.B. Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen und/oder mehrere Detektionseinheiten verwenden. Diese werden dann versetzt entlang des Flüssigkeitsstrahls angeordnet. Durch Kalibrierung kann dann die Lokalisation der einzelnen Meßstrukturen bzw. Kalibriertargets unterschiedlicher spektraler Signatur zueinander in Bezug gesetzt werden. Die Kalibrierung und Berechnung erfolgt analog den vorstehend geschilderten Beispielen für die Epifluoreszenz- bzw. konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.

BEISPIEL 6: Einsatz des erfindungsgemäßen Distanzmessungsverfahrens zur optischen Kontrolle von Anordnungen elektronischer Bauelemente (elektronischer Chips)

Bei der Anordnung von elektronischen Bauelementen (elektronischen Chips) muß die planmäßige Anwesenheit bestimmter Bauelemente und deren geometrische Anordnung überprüft werden. Da die handelsüblichen Chipabmessungen sehr gering sind und die einzelnen Bauelemente in enger Nachbarschaft zueinander liegen, sind die erforderlichen Kontrollverfahren nach dem Stand der Technik extrem aufwendig und nicht immer zufriedenstellend genau.

Das erfindungsgemäße Distanzmessungsverfahren ermöglicht nun eine Überprüfung der vorgegebenen Anzahl und Anordnung der Bauelemente auf dem Chip auch in solchen Fällen, in denen der Minimalabstand zwischen einzelnen Chips kleiner oder sogar sehr viel kleiner ist als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion.

Hierzu werden die Bauelemente z.B. auf ihrer Oberfläche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, wobei zumindest diejenigen Bauelemente, deren Abstand untereinander kleiner als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion ist, mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher spektraler Signatur versehen werden.

Die Kontrolle der korrekten Anordnung der Bauelemente kann nun durch optische Analyse unter Einsatz des erfindungsgemäßen Distanzmessungsverfahrens und unter Verwendung beliebiger Fernfeldmikrosokopieverfahren durchgeführt werden, wobei anstelle der herkömmlicherweise notwendigen Objektive mit relativ sehr hoher numerischer Apertur von beispielsweise 1,3 nun ohne weiteres Objektive mit wesentlich geringerer numerischer Apertur eingesetzt werden können, ohne daß dadurch hier relevante Information verloren geht. Mit den Objektiven geringerer Apertur geht ein höherer Arbeitsabstand zwischen Objektiv und Untersuchungsobjekt einher, was die Handhabung wesentlich erleichtert und die Untersuchungen schneller und sicherer macht. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann auch die vorschriftsmäßige Anordnung von solchen Bauelementen überprüft werden, deren Abstand untereinander kleiner als 200 nm ist. Das hat den Vorteil, daß auf den Einsatz von technisch sehr aufwendigen optischen Nahfeldverfahren und/oder Verfahren der atomaren Kraftmikroskopie oder der Tunnelelektronenmikroskopie verzichtet werden kann.

Anstelle von elektronischen Chips ist es ebensogut möglich, DNA-Chips oder Protein-Chips in analoger Weise zu überprüfen.

Ansprüche

1. Verfahren für die Fernfeldmikroskopie und Flußfluorometrie zur geometrischen Distanzmessung zwischen Objektstrukturen, wobei die Distanzen geringer sein können als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion, dadurch gekennzeichnet,

daß vor, während oder nach der Präparation des betreffenden Objekts auf einem bzw. in einem Objekthalter, insbesondere Objektträgerplättchen, Objektträgerfaser, Objektträgerkapillare oder Objektträgerflüssigkeit, die zu untersuchenden bzw. zu ortenden Objektstrukturen — ist gleich Meßstrukturen — mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener oder gleicher spektraler Signatur markiert werden, wobei zumindest solche zu ortenden Meßstrukturen, deren Abstand voneinander geringer ist als die Halbwertsbreite des Hauptmaximums der effektiven Punktbildfunktion, mit Fluoreszenzfarbstoffen verschiedener spektraler Signatur markiert werden,

daß mit den gleichen Fluoreszenzfarbstoffen Kalibriertargets definierter Größe und räumlicher Anordnung markiert werden,

daß die fluoreszierenden Kalibriertargets entweder zusammen mit den Objekten bzw. Meßstrukturen oder separat auf bzw. in dem bzw. einem Objekthalter präpariert werden,

daß Meßstrukturen und Kalibriertargets unter übereinstimmenden Bedingungen, gleichzeitig oder nacheinander mikroskopisch oder flußfluorometrisch untersucht werden,

und daß jeweils zwei definierte Kalibriertargets verschiedener spektraler Signatur unter Berücksichtigung des wellenlängenabhängigen Abbildungs- und Lokalisationsverhaltens des jeweiligen optischen Systems vermessen werden, die dabei ermittelten Messwerte — gleich Ist-Werte — mit den vorbekannten tatsächlichen Distanzwerten — gleich Soll-Werten — verglichen werden, und aus der Differenz zwischen Ist-Werten und Soll-Werten ein Korrekturwert — ist gleich Kalibrierwert — bestimmt wird, mit dem der durch das optische System bedingte Versatz in der Detektion unterschiedlicher Emissionsloci, insbesondere der Meßstrukturen, korrigiert wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß das biologische Objekt während der mikroskopischen Untersuchung axialtomographisch gedreht wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
daß das biologische Objekt in oder an einem drehbaren Objekthalter (ist gleich Objektträger) mit kreisförmigem, rechteckigem oder vieleckigem Querschnitt fixiert oder in anderer Weise befestigt ist, wobei der Objekthalter (Objektträger) hohl oder massiv ist und aus einem für die verwendeten Lichtwellenlängen transparenten Material besteht, dessen Brechungsindex sich um höchstens 12 % von dem des umgebenden Mediums unterscheidet und dessen Querschnittsdurchmesser kleiner oder gleich 300 µm ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,
daß die Drehung des im Querschnitt dreieckigen, viereckigen oder vieleckigen Objekthalters (Objektträgers) um die Winkel $\phi_m = 360/3$ [°], $\phi_m = 360/4$ [°], oder $\phi_m = 360/n$ [°] erfolgt, wobei n die Zahl der planaren Seiten des Objekthalters (Objektträgers) ist, und daß bei einem, mehreren, oder jedem dieser Winkel eine Abstandsmessung zwischen den Kalibriertargets und/oder Meßstrukturen für eine oder zwei oder mehrere spektrale Signaturen vorgenommen wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4 dadurch gekennzeichnet, daß zur Ermittlung von Ist- und Sollwerten, zu deren Vergleich und zur Bestimmung des Korrekturwertes (ist gleich Kalibrierwert) die folgenden Verfahrensschritte durchgeführt werden:

- ein oder mehrere Kalibriertargets B mit einem Abstand größer als die Halbwertsbreite des Hauptmaximum der effektiven Punktbildfunktion vom Schwerpunkt der N Meßstrukturen wird/werden mit einer beliebigen spektralen Signatur markiert,
- die Abstände d_{ik} (i, k = 1... N, i ≠k) der Schwerpunkte der spektral getrennten Beugungsfiguren der N Meßstrukturen und die Abstände d_{iB} der N Meßstrukturen zum Kalibriertarget B werden gemessen, wobei automatisierte Verfahren der Bildanalyse angewendet werden,
- für eine Meßstruktur werden die Strecken d_{ik} und d_{iB} jeweils in der Ebene der schmalsten Punktbildfunktion sowie alle übrigen Distanzen gemessen werden, wozu das Objekt axialtomographisch jeweils um einen definierten Winkel ϕ_m gedreht wird,
- optische Aberrationen aus den Kalibrierungsmessungen werden korrigiert, und an die korrigierten gemessenen Abstände d_{ik} (ϕ_m) und d_{iB} (ϕ_m) wird jeweils eine Cosinusfunktion $A_{ik} \cos (\phi_m + \theta_{ik})$ bzw. $A_{iB} \cos (\phi_m + \theta_{iB})$ mit geeigneter Phasenverschiebung angepaßt,
- die Maxima A_{ik} und A_{iB} der Anpassungsfunktion von d_{ik} bzw. d_{iB} werden durch den Vergrößerungsfaktor dividiert und als euklidischer Abstand D_{ik} bzw. D_{iB} der N Meßstrukturen untereinander bzw. der Abstände der Meßstrukturen zum Bezugspunkt B bestimmt.

6. Verfahren nach Anspruch 5 dadurch gekennzeichnet, daß für die Bestimmung der Maxima zusätzlich das diesem entsprechende Minimum des Abstandes z_{ik}, z_{iB} in der zu der Ebene der d_{ik}, d_{iB} orthogonalen Ebene herangezogen und analog verfahren wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6 dadurch gekennzeichnet,
daß die 3D-Abstände D_{ik} bzw. D_{iB} in einem Gleichungssystem
$D^2_{ik} = (x_k - x_i)^2 + (y_k - y_i)^2 + (z_k - z_i)^2$
$D^2_{iB} = (x_B - x_i)^2 + (y_B - y_i)^2 + (z_B - z_i)^2$
$D^2_{kB} = (x_B - x_k)^2 + (y_B - y_k)^2 + (z_B - z_k)^2$
zur Berechnung der Positionen x_i, y_i, z_i und x_k, y_k, z_k bzw. der Abstände $x_k - x_i$, $y_k - y_i$, $z_k - z_i$ und $x_B - x_i$, $y_B - y_i$, $z_B - z_i$, d.h. zur Berechnung aller Koordinaten der N Meßstrukturen und ihrer Relativkoordinaten zum Bezugspunkt B, verwendet werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet,
daß die Vorgehensweise für mehre Kalibriertargets B und die gleichen N Meßstrukturen durchgeführt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
daß die Koordinaten und Abstände der N Meßstrukturen anhand der Schwerpunkte ermittelt werden, die aus Schwerpunktmittelungen der Messungen zu allen Bezugspunkten bestimmt werden.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet,
daß die erhaltenen Positionen x_i, y_i, z_i und x_B, y_B, z_B mit einer Punktbildfunktion gefaltet werden, die eine Halbwertsbreite mit dem jeweils erreichten Auflösungsäquivalent besitzt, und anschließend nach bekannten Verfahren graphisch dargestellt werden.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet,
daß die zu ortende(n) Meßstruktur(en) mit Fluorochromen verschiedener spektraler Signatur und gleicher Dynamik markiert ist/sind.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß als Kalibriertargets markierte Regionen bekannter Distanz des biologischen Objekts verwendet werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Kalibriertargets Mikrokügelchen mit gleicher oder höherer multispektraler Signatur als die zu ortenden Meßstrukturen verwendet werden.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Kalibriertargets auf Objekthaltern, insbesondere Objektträgerplättchen, Objektträgerfasern oder Objektträgerkapillaren, in definierter Raumanordnung fixiert sind.

15. Halterung für einen Objekthalter (Objektträger) zur Durchführung eines Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, bestehend aus einem starren, vorzugsweise dorsiventral abgeplatteten Rahmen mit im wesentlichen der gleichen Länge, Breite und Höhe wie ein herkömmliches Glasobjektträgerplättchen gemäß DIN 58884, an bzw. auf dem wenigstens eine Lagerbuchse montiert ist, in der ein röhren- oder rinnenförmiger bjekthalter), insbesondere eine Mikrokapillare oder eine Glasfaser, um sein (ihre) Längsachse rotierbar und mit der Rotationsachse senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops lagerbar ist, wobei die Lagerbuchse(n) derart angeordnet sind, daß die Rotationsachse der Kapillare/Faser senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops verläuft, und daß wenigstens ein Endabschnitt des röhren- oder rinneförmigen Objekthalters als Angriffsort für eine Drehkraft zur Drehung des Objekthalters zugänglich ist.

16. Halterung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,
daß ein austauschbarer Einsatz für den Rrahmen vorgesehen ist, der dazu geeignet ist, die Ausnehmung des Rahmens ganz oder teilweise abzudecken, und der vorzugsweise aus Plastik oder Glas besteht.

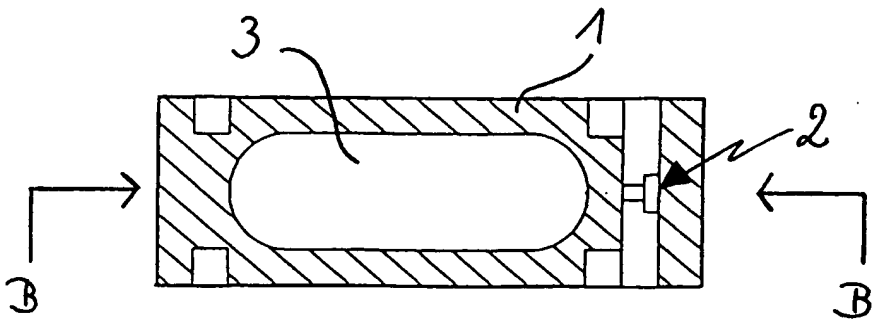
17. Halterung nach Anspruch 16 dadurch gekennzeichnet,
daß der Einsatz eine grabenförmige Vertiefung in Längsrichtung des röhren- oder rinneförmigen Objekthalters (Objektträgers) aufweist.

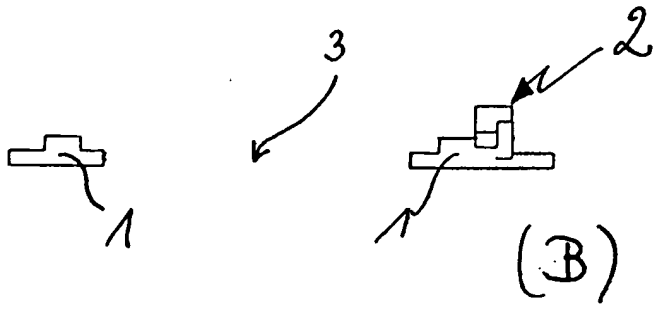
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 unter Verwendung eines Laser-Scan-Flußfluorometers mit einem Durchflußcytometer, das einen frei oder in einer Küvette strömenden Flüssigkeitsstrahl umfaßt, mit einer oder mehreren Laserstrahlquelle(n), deren Laserstrahl(en) auf die zentrale Trajektorie des Flüssigkeitsstrahls fokussiert sind, und mit einem Detektionssystem aus Detektor(en), Linse(n) und Blende(n) , dadurch gekennzeichnet,
daß der/die Laserstrahl(en) bandförmig auf die Objekttrajektorie fokussiert ist/sind.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet,
daß die Bandform des/der Laserstrahls/Laserstrahlen durch Interferenzstreifen zweier oder mehrerer sich kreuzender Teilstrahlen erzeugt wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet,
daß die Linsen und Blenden im Detektionsstrahlengang derart ausgewählt und angeordnet sind, daß allein die Fluoreszenzemission aus dem zentralen Interferenzstreifen auf den/die Detektor(en) abgebildet wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20, dadurch gekennzeichnet,
daß der/die Detektor(en) in einzelne Detektionspixel aufgeteilt ist/sind und zur räumlichen Auflösung der Fluoreszenzemission sowohl in Flußrichtung als auch senkrecht zur Flußrichtung geeignet ist/sind.





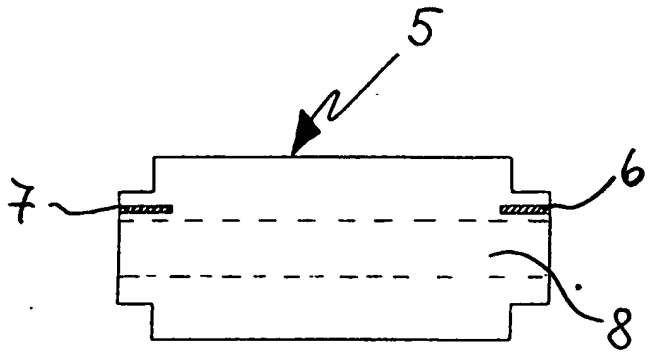


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. ...nal Application No
PCT/DE 97/02994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01B9/04 G02B21/16 G02B21/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01B G02B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 414 258 A (LIANG LOUIS H) 9 May 1995 see abstract; figures 5,6	1,15
A	US 4 650 335 A (ITO TOKUHISA ET AL) 17 March 1987 see abstract; figure 1	1
A	US 3 401 458 A (MORA ZOLTAN PAUL) 17 September 1968 see abstract; claim 1; figures 1,2	1
A	DE 32 26 407 A (RENNER DIETER;DANIEL VOLKER DR) 19 January 1984 see abstract; figures 1-4	15
A	DE 26 13 582 B (CUBANA EXPORT IMPORT) 1 February 1979 see claim 1; figure 1	15

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

2

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 March 1998	14.04.98

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Vorropoulos, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. onal Application No
PCT/DE 97/02994

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5414258 A	09-05-95	NONE	
US 4650335 A	17-03-87	JP 1017523 B	30-03-89
		JP 1534106 C	12-12-89
		JP 59099304 A	08-06-84
US 3401458 A	17-09-68	NONE	
DE 3226407 A	19-01-84	NONE	
DE 2613582 B	13-10-77	DE 2613582 A	13-10-77

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/02994

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01B9/04 G02B21/16 G02B21/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01B G02B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 414 258 A (LIANG LOUIS H) 9.Mai 1995 siehe Zusammenfassung; Abbildungen 5,6 ---	1,15
A	US 4 650 335 A (ITO TOKUHISA ET AL) 17.März 1987 siehe Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	1
A	US 3 401 458 A (MORA ZOLTAN PAUL) 17.September 1968 siehe Zusammenfassung; Anspruch 1; Abbildungen 1,2 ---	1
A	DE 32 26 407 A (RENNER DIETER;DANIEL VOLKER DR) 19.Januar 1984 siehe Zusammenfassung; Abbildungen 1-4 ---	15
	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenc. Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
30.März 1998	14.04.98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Vorropoulos, G

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 97/02994

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 26 13 582 B (CUBANA EXPORT IMPORT) 1.Februar 1979 siehe Anspruch 1; Abbildung 1 -----	15

2

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inten. ..nales Aktenzeichen
PCT/DE 97/02994

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5414258 A	09-05-95	KEINE	
US 4650335 A	17-03-87	JP 1017523 B	30-03-89
		JP 1534106 C	12-12-89
		JP 59099304 A	08-06-84
US 3401458 A	17-09-68	KEINE	
DE 3226407 A	19-01-84	KEINE	
DE 2613582 B	13-10-77	DE 2613582 A	13-10-77